



# Studies on molecular design and synthesis of artificial nucleic acids for the hypoxia-selective RNase H mediated catalytic oligonucleotide therapeutics

著者	稲垣 雅仁
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第18446号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00125506">http://hdl.handle.net/10097/00125506</a>

Doctoral Thesis (博士論文)

Studies on molecular design and synthesis of artificial  
nucleic acids for the hypoxia-selective RNase H mediated  
catalytic oligonucleotide therapeutics

(虚血性疾患選択的核酸医薬を指向した人工核酸の  
分子設計と合成ならびに触媒的核酸医薬への展開)

Masahito Inagaki

(稲垣 雅仁)

2018 年 (平成 30 年)

# **TABLE OF CONTENTS**

List of Abbreviations

CHAPTER I. General Introduction—Overview of Nucleic Acids Chemistry for  
the Oligonucleotide Therapeutics

CHAPTER II. Hypoxia-Selective Oligonucleotide Therapeutics

CHAPTER III. Catalytic Oligonucleotide Therapeutics

CHAPTER IV. DNA-Artificial Nucleic Acids Chimeras for the Practical  
Oligonucleotide Therapeutics

General Conclusion

Acknowledgements

## 第1章. 緒言

核酸医薬は、抗体医薬では標的とできない疾患に適用でき、また化学合成により比較的安価に供給できること等多数の利点を有し、抗体医薬と相補的で汎用性の高い新規治療法として期待されている。核酸医薬の一つの方法論であるアンチセンス核酸(ASO)は、疾患進行に関与する mRNA や miRNA 等を標的とし、塩基配列選択的に複合体を形成することで、疾患原因 RNA の機能を抑制し治療効果を発現する。これら核酸医薬の、より有効な薬効発現には1)高い生体内安定性、2)標的 RNA に対する高い選択性と複合体安定性が求められ、天然型核酸に化学修飾を施した人工核酸の開発が精力的に研究されている。これまで優れた人工核酸が報告されているものの、標的核酸と類似配列を有する非標的核酸への結合に起因する副作用(狭義のオフターゲット効果)、標的核酸認識に依存しない核酸医薬特有の毒性(広義のオフターゲット効果)の発現が実用化に向けて解決すべき課題として指摘されている。

## 第2章. 虚血性疾患選択的核酸医薬の創製

狭義のオフターゲット効果の克服、特に増幅期の癌等に代表される虚血性疾患を標的とした選択的核酸医薬開発に資する新規方法論構築に取り組んだ。虚血性疾患では、低酸素環境により解糖系代謝経路への変化が誘起され、乳酸等の蓄積に起因する細胞内 pH の低下が報告されている。当研究室では、この細胞内 pH の低下に着目し、虚血性疾患細胞に特徴的な弱酸性環境に応答し、標的細胞選択的に治療効果を発揮する新規人工核酸としてペプチドリボ核酸(PRNA)を報告してきた。PRNA は、低 pH 環境では核酸塩基が *anti* 配向を優先し、標的核酸と安定な複合体を形成する。一方、正常細胞内中性環境下では、ホウ酸類と PRNA の 2',3'-シスジオールとの環状ボロン酸エステル形成に駆動される糖部構造変化ならびに 5'位アミド水素と 2 位カルボニル酸素との水素結合形成に誘起され、核酸塩基部配向が *anti* から *syn* へと変化し、標的核酸結合能を失う。このように PRNA は、低 pH 標的細胞内でのみ薬効を発現する優れた核酸医薬として期待されているが、外部からホウ酸誘導体の添加が必要であるという課題も有していた。本研究では本課題克服のため、フェニルボロン酸(PBA)を分子内に組み込んだ第二世代 PRNA を設計した。虚血性疾患において、その細胞内 pH は疾患ならびに疾患進行度によって多様性に富むことが報告されている。このため PRNA を用いた疾患細胞選択的薬効発現戦略を適用するためには、対象疾患内 pH に対応する核酸塩基部配向変化に起因する薬効発現の *on-off*制御 pH ( $pK_s$ ) の調節が必要となる。本課題解決のため、円二色性(CD)pH 滴定実験により、様々な置換基を有する PBA との  $pK_s$  を算出したところ、Hammett 則の置換基定数  $\sigma$  と  $pK_s$  が良好な直線関係を示すことが明らかとなった。フェニルボロン酸誘導体添加系における  $pK_s$  の基質濃度依存性したところ、濃度上昇に伴い一定の傾きを保ったまま Hammett プロットが低  $pK_s$  側へシフトすることが明らかとなった。次に、PBA を分子内に導入した PRNA-PBA を用い同様に  $pK_s$  を検討した結果、 $pK_s$  と  $\sigma$  とが良い直線関係を示した。興味深いことに分子内反応系の Hammett プロットの傾きは、分子間エステル結合形成系の傾きと誤差範囲内で一致し、切片のみが大きく低  $pK_s$  側にシフトすることが明らかとなった。つまり、分子

内への PBA ユニットの導入により PRNA に対する PBA の局所濃度が増大し、極めて効率的な環状ポロン酸エステル結合形成が実現でき得ることが示された。次に分子内反応系の  $pK_s$  の濃度依存性について検討したところ、濃度依存性は示さないことが明らかとなった。すなわち PRNA-PBA 系では、投与量、細胞内濃度に依存せず、 $pK_s$  により推定される薬効発現の *on-off* 制御が達成可能であることが示唆された。本結果に基づき、脳梗塞周辺のペナンプラと呼ばれる虚血領域 (pH 6.2–6.3) を標的とした PRNA の調整に取り組んだ。ペナンプラと正常細胞 (pH 7.2) とを明確に識別するためには、その中点となる  $pK_s = 6.6–6.7$  への調整が最適と予想され、 $pK_s = 6.7$  を示す PRNA-PBA として 3-amide-4-methoxy 体を選択した。実際に目的 PRNA-PBA を合成し、CD 滴定実験により  $pK_s$  を算出したところ  $pK_s = 6.6$  となり、推定値と極めて良い一致を示した。次に PRNA の *anti-syn* 塩基部配向変化を駆動力とする、標的 RNA との複合体形成の *on-off* 制御の実証を目指し、 $pK_s = 6.6$  に調整した PRNA-PBA を導入した PRNA-ペプチド核酸 (PNA) オリゴマーを設計し、次に PRNA の *anti-syn* 塩基部配向変化を駆動力とする、標的 RNA との複合体形成の *on-off* 制御の実証を目指し、PRNA-ペプチド核酸 (PNA) オリゴマーを合成した。オリゴマーと標的 DNA/RNA との複合体形成挙動を、 $T_m$  測定により評価したところ、虚血領域 (pH 6.2) と正常細胞内 (pH 7.2) とで、 $\Delta T_m$  10–22 °C に相当する明確な複合体形成制御に成功した。以上、本章では標的虚血性疾患細胞内 pH を指標とし、Hammett プロットに基づく理論的推定により、適切な PRNA-PBA ユニットを設計し、オリゴマーを合成することにより、PRNA 塩基部の *anti-syn* 配向変化に駆動される標的 RNA との複合体形成の *on-off* 制御が達成できることを明らかにした。本方法論を用いることにより、オフターゲット効果を克服した安全・安心な虚血性疾患選択的核酸医薬系構築への展開が期待される。

### 第 3 章. 触媒的核酸医薬の創製

広義のオフターゲット効果の改善には、核酸医薬の投与量の低減が提案されている。本課題を達成するために、少量の核酸医薬でも効果的な薬効発現が期待される RNase H を活用した触媒的核酸医薬法が注目されている。RNase H は DNA•RNA 二重鎖を認識し、RNA 鎖のみを切断する酵素である。高効率な触媒的 ASO 系構築には、RNase H による標的 RNA の切断効率向上のみならず、代謝回転数の増加が有効な方法論として期待される。この観点から、RNA 切断後の解離過程に着目し、切断後標的 RNA の複合体からの迅速解離を実現出来れば、代謝回転数増加が実現できると発案した。すなわち、RNaseH による RNA 切断後、ASO との複合体の安定性が 37 °C 以下になれば、迅速解離が期待される。本方法論達成のため、RNase H-DNA•RNA 複合体の X 線結晶構造を詳細に検討した。その結果、RNase H の切断活性サイトの近傍に DNA が結合する塩基性チャネルが存在し、このチャネルへの ASO 分子の結合位置を制御できれば、標的 RNA 結合位置ならびに切断部位も必然的に制御できると予想した。塩基性チャネルへの ASO 分子の結合位置の制御を目指し、負電荷を有する DNA 骨格と電荷を持たないアミド骨格人工核酸 (PNA/PRNA) を融合したキメラ分子を設計した。実際に DNA-PNA/PRNA キメラ分子を合成し、RNase H による標的 RNA との複合体の RNaseH による切断を詳細に検討した結果、予想通りジャンクシヨ

ン部位近傍での選択的な RNA 切断が観測され、切断活性は著しく向上した。さらに、無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質発現抑制効果を検討したところ、RNase H 存在下において mRNA に対してキメラ分子を 0.1 当量しか投与していないにも関わらず、90%ものタンパク質発現抑制効果を示し、その有効性の実証に成功した。以上、本章ではアニオン骨格を有する DNA と電荷を持たないアミド骨格を有する人工核酸を融合したキメラ分子を用いることにより、RNase H に対する DNA 結合位置が制御可能となり、標的 RNA の位置選択的切断ならびに代謝回転数の飛躍的向上が実現出来ることが明らかとなった。本方法論は、モルフォリノ核酸やメチルホスホネート核酸など他の人工核酸系へと展開可能であり、配列選択的 RNA 切断やゲノム編集ツールとしての展開も期待される。

## 第 4 章. DNA-人工核酸キメラ分子の実用的な核酸医薬への展開

第 3 章では、高効率触媒的核酸医薬系の構築を目的とした、DNA-PRNA/PNA キメラ分子を開発した。しかし、本キメラ分子は 3'側に未修飾 DNA 部位を有しており実用的な核酸医薬医薬としての展開を見据えると、ヌクレアーゼ耐性、標的核酸結合特性などの克服が必要である。本目的達成のため、3'-DNA 末端に対して糖部架橋型人工核酸 (LNA) を導入した *hemi-gapmer* 型キメラ人工核酸を設計・合成した。本新規キメラ分子は 3'-DNA 未修飾体と比較して顕著に高いヌクレアーゼ耐性を示し、結合定数  $10^{12} \text{M}^{-1}$  オーダーに相当する極めて高い標的核酸結合特性を有することを明らかにした。さらに、DNA 塩基数の異なる 6 種類もの *hemi-gapmer* 型誘導体を合成し、RNase H 活性の DNA 塩基数依存性について詳細に検討した。その結果、RNA 切断位置選択性を損なうことなく高い RNase H 活性を発揮するためには、RNase H の DNA 結合チャンネルサイズに相当する 5–6 塩基長の DNA から構成される *hemi-gapmer* 型核酸が最適であることを見出した。無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質発現抑制実験においても、*hemi-gapmer* 型核酸は 3'-DNA 未修飾体と比較して構成 DNA 塩基長に依存した高い翻訳阻害活性を示した。さらに、細胞/動物レベルでの機能発現系への展開を想定し、細胞内分子夾雑(分子クラウディング)条件における標的核酸認識・RNase H 活性を検討したところ、*hemi-gapmer* 型核酸は分子夾雑条件において RNase H 活性がさらに増強されることを新たに見出し、より実用的な核酸医薬への展開が期待される。

## 結論

本研究では、核酸医薬の実用化へ向けての課題となるオフターゲット効果の克服を目指し、虚血性疾患選択的核酸医薬として展開しうる細胞内環境応答型人工核酸を開発した。さらに、投与薬剤量削減による毒性リスク低減を目指し、RNase H 活性の飛躍的向上による高効率触媒的核酸医薬系を構築した。さらに、より実用的な核酸医薬としての展開を指向した *hemi-gapmer* 型キメラ人工核酸を開発した。これら新規方法論は一般性が高く、様々な人工核酸との融合ならびに様々な疾患への適用が可能であり、今後のさらなる発展が期待される。